

ANTI-AGE

КОСМЕТОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Клеточное омоложение на уровне митохондрий

Как и чем
подзарядить клетки?

Физиологический подход в косметологии

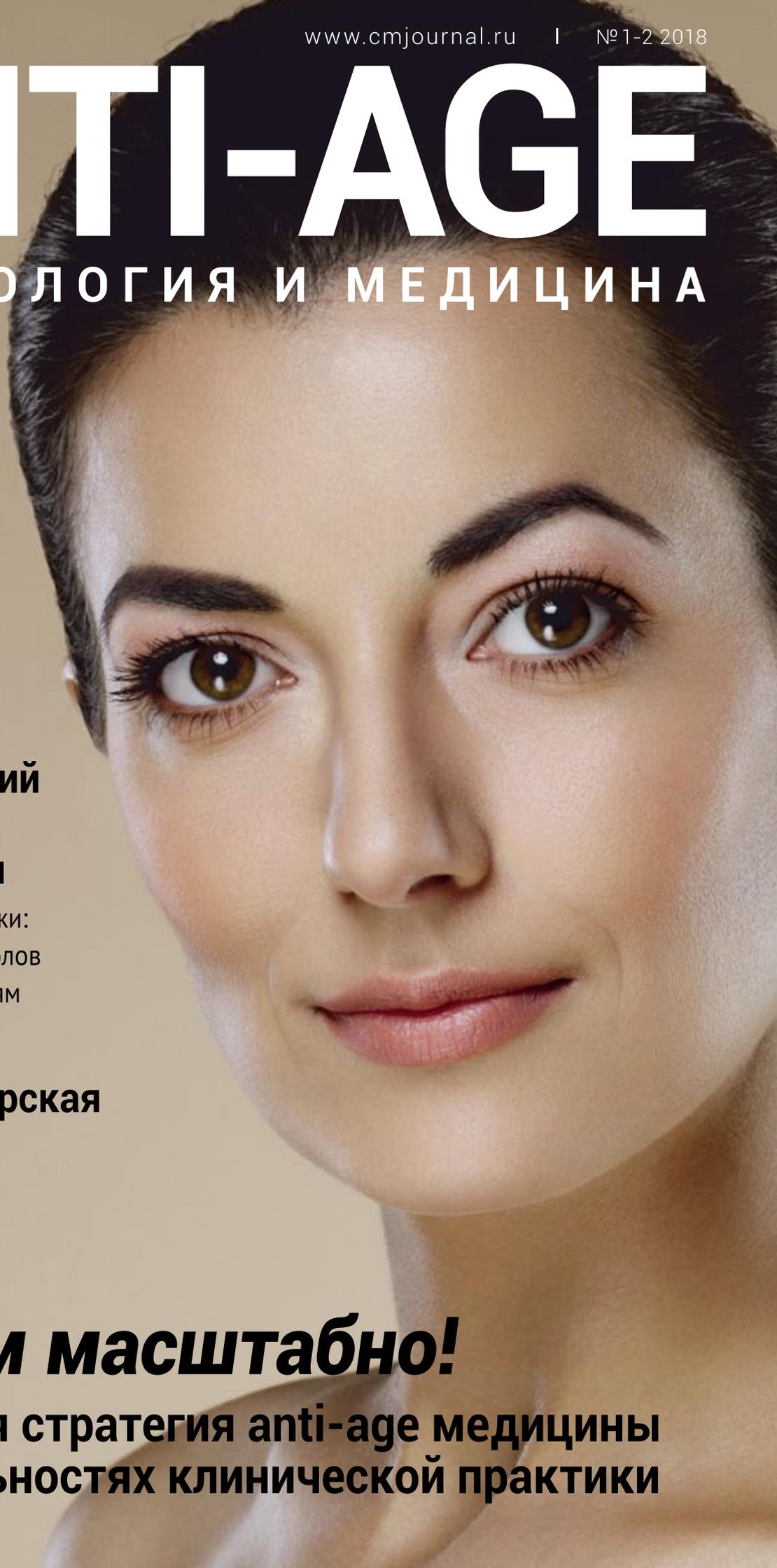
Методы омоложения кожи:
от классических протоколов
к современным решениям

Средиземноморская диета

укрепит здоровье
и продлит молодость

Мыслим масштабно!

**Комплексная стратегия anti-age медицины
в реальностях клинической практики**





ЗОРИНА АЛЛА ИВАНОВНА

К.м.н., главный специалист по применению клеточных технологий ПАО «Институт стволовых клеток человека», Москва



ЗОРИН ВАДИМ ЛЕОНИДОВИЧ

К.б.н., руководитель отдела регенеративной медицины ПАО «Институт стволовых клеток человека», генеральный директор ООО «Витацел», Москва



КОПНИН ПАВЕЛ БОРИСОВИЧ

К.б.н., заведующий лабораторией цитогенетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Определение регенераторного потенциала кожи

Ключевые слова:
 возрастные изменения кожи, регенераторный потенциал кожи, регенераторный и пролиферативный потенциалы фибробластов кожи, косметологическое remodelирование дермы

В статье описан метод определения регенераторного потенциала кожи, основанный на определении величин регенераторного и пролиферативного потенциалов дермальных фибробластов. Проанализированы возможности косметологического remodelирования дермы. Знание показателей регенераторного потенциала кожи может быть полезным врачу-косметологу при составлении оптимальной индивидуальной программы ухода за кожей и коррекции ее возрастных изменений, прогнозировании выраженности клинического эффекта коррекции и предупреждении многих осложнений, возможных при косметологических вмешательствах.

Старение кожи, как и организма в целом, представляет собой сложный биологический процесс, на который влияет множество факторов, включая генетические, эпигенетические, воздействие окружающей среды. Установлено, что в основе процессов, развивающихся в коже при старении, лежат фундаментальные изменения, связанные с основной клеточной популяцией дермы — фибробластами: их количеством, морфологией, пролиферативным потенциалом, функциональной активностью [1–5]. Они не только поддерживают гомеостаз внеклеточного матрикса дермы, обеспечивая его remodelирование

и обновление (за счет деградации «отработанных» и синтеза новых компонентов дермы — коллагена, эластина и основного вещества), но также играют значительную роль в поддержании физиологического состояния других слоев кожи, представляя собой ключевое звено в ее биологии [1].

С возрастом в популяции фибробластов кожи уменьшается количество клеток, снижается их биосинтетическая активность, нарушается баланс между процессами синтеза и деградации внеклеточного матрикса дермы. Так, исследование Варани Дж. (Varani J.) и соавт. (2006) показало, что у пожилых людей,

по сравнению с молодыми, общее количество фибробластов в коже меньше в среднем на 35% [2]. По данным Фишер Г. (Fisher G.) и соавт., продукция коллагена в коже старых людей в среднем снижена на 75% [4]. Естественное следствие этих процессов — уменьшение толщины кожи, снижение ее упругости и эластичности, образование морщин.

Целью применения целого ряда методов современной косметологии — мезотерапии, биоревитализации, пилингов, фракционного фототермолиза, радиоволновой терапии, дермабразии и др. — является стимуляция функциональной активности дермальных фибробластов: пролиферативной, за которую отвечают клетки-предшественники фибробластов, и биосинтетической, в которой главенствуют зрелые, дифференцированные клетки, численность которых, в свою очередь, зависит от количества клеток-предшественников фибробластов.

По всей видимости, именно содержание в дерме клеток-предшественников фибробластов и их способность к пролиферации определяют выраженность клинического эффекта у разных пациентов одного пола и одной и той же возрастной группы при получении ими одинаковых косметологических процедур. В этой связи большое значение имеет знание величин регенераторного и пролиферативного потенциалов фибробластов дермы, поскольку оно может помочь врачу-косметологу не только составить оптимальную программу ухода за кожей, но и прогнозировать выраженность клинического эффекта у пациента после применения какой-либо процедуры, выполняемой на интрадермальном уровне.

Определение величин регенераторного и пролиферативного потенциалов фибробластов дермы

Известно, что фибробласты — гетерогенная клеточная популяция, включающая весь фибробластический дифферон (рис. 1): от мультипотентной мезенхимальной стволовой клетки, прогениторных клеток и дифференци-

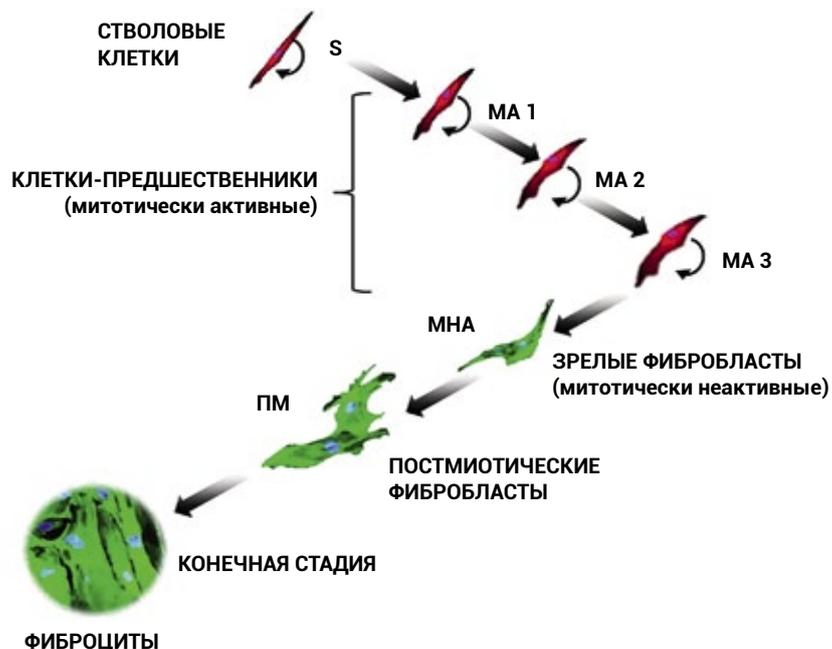


РИС. 1. Общая схема фибробластического дифферона дермы [5]

рованных (зрелых) фибробластов до конечно дифференцированного фиброцита [5, 6]. Это означает, что в дерме каждого человека присутствуют стволовые/прогениторные клетки (клетки-предшественники фибробластов), основная задача которых — поддержание клеточной популяции ткани. Обнаружить эти клетки можно в культуре, наблюдая процесс образования колоний — клонов, состоящих из 50 и более клеток (рис. 2), каждый из которых представляет собой потомство одной клетки-предшественницы [7–9] (рис. 3).



РИС. 2. Распределение колоний в культуре фибробластов в зависимости от их пролиферативного потенциала [8, 24]

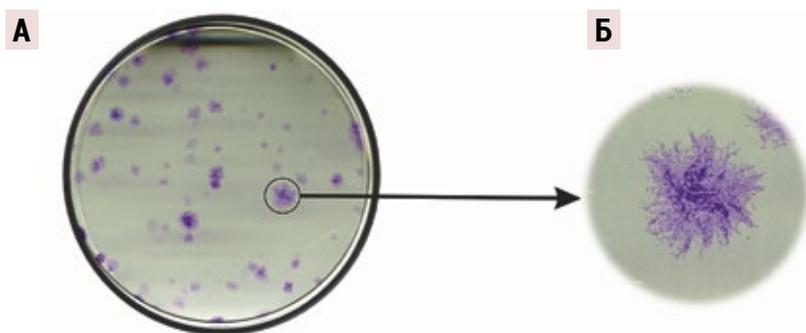


РИС. 3. Эффективность колониобразования фибробластов. А — колонии выросших фибробластов, Б — одна из колоний при большем увеличении [8]

Процесс возрастных изменений кожи сводится к уменьшению в ней численности популяции фибробластов и снижению их пролиферативной и биосинтетической активности, что закономерно проявляется в уменьшении количественного и качественного состава внеклеточного матрикса дермы. В этой связи становится совершенно очевидным, что именно дермальные фибробласты представляют собой основную точку приложения терапевтического воздействия при коррекции возрастных изменений кожи.

Для этого используют специфический метод избирательного клонирования фибробластов и определяют эффективность колониобразования фибробластов (ЭКОф) [7, 10–14]. Метод заключается в следующем. Из 4 мм биоптата кожи пациента в специализированной лаборатории получают первичную культуру фибробластов, из которой берут строго определенное (и всегда одинаковое) количество клеток. Данные клетки эксплантируют (высевают) в чашки Петри и культивируют при строго определенных и всегда одинаковых условиях. Спустя 14 дней, используя специальную компьютерную программу, проводят подсчет образовавшихся колоний и определяют величину ЭКОф, которая представляет собой отношение выросших колоний (клеточных клонов, состоящих из 50 и более клеток) к числу эксплантированных клеток [14].

Величина ЭКОф, как показали результаты исследований, это генетически предопределенная величина, индивидуальная для каждого человека [13, 15, 16]. Определив эту величину, в пересчете на массу биоптата, можно получить представление о содержании в коже каждого человека стволовых/прогениторных клеток. Благодаря функционированию последних и осуществляется восстановление/обновление дермы. На основании значений ЭКОф можно сделать заключение об индивидуальном регенераторном потенциале кожи, т.е. о способности популяции дермальных фибробластов конкретного человека поддерживать гомеостаз кожной ткани и восстанавливать ее при повреждении.

Чем больше значение ЭКОф, тем больше в коже клеток-предшественников фибробластов, а значит, после их стимуляции в данной ткани будет больше дифференцированных (зрелых) функционально активных фибробластов, — следовательно, выше ее регенераторный потенциал; и наоборот, чем меньше ЭКОф, тем ниже регенераторный потенциал кожной ткани.

Наряду с исследованием регенераторных возможностей фибробластов кожи пациента косметологу важно знать, каков пролиферативный потенциал этих клеток (количество делений, которое клетки могут пройти до своей гибели). Его определяют по процентному соотношению долей плотных, диффузных и смешанных колоний в культуре фибробластов кожи пациентов (рис. 2) [14, 17, 18]. Очевидно, чем выше пролиферативный потенциал клеток, составляющих данную ткань, тем больше в них митотически активных клеток и, следовательно, тем быстрее будут осуществляться регенеративные процессы.

Как определяют пролиферативный потенциал фибробластов?

Прогениторные клетки дермы, согласно результатам исследования их цитоморфологии, пролиферативного потенциала и способности синтезировать специфические факторы роста/цитокины, разделяют на 3 типа клеточных популяций митотически активных фибробластов (МФ): МФI, МФII и МФIII [19]. При этом клеточный пул МФI обладает самым высоким пролиферативным потенциалом, его клетки проходят около 25–30 клеточных делений перед дифференцировкой в клеточную популяцию МФII. В свою очередь, клетки пула МФII до перехода в пул МФIII совершают около 15–20 делений, а клетки пула МФIII перед дифференцировкой в постмитотические фибробласты (ПМФ) осуществляют всего около 5–8 делений. Соответственно в культуре МФ образуют 3 вида колоний (рис. 1):

- плотные, состоящие из сотен и даже тысяч фибробластов, что, по всей видимости, соответствует стадии диф-

ференцировки митотически активных клеток-предшественников МА1;

- диффузные, состоящие из 50–100 клеток, что, видимо, соответствует стадии дифференцировки МА3;
- смешанные, состоящие из фибробластов, находящихся на стадиях дифференцировки МА1 и МА3.

Учитывая долю каждого типа колоний с помощью специальной формулы, разработанной профессором Е.Б. Владимирской [18] для стромальных клеток-предшественников, определяют показатель пролиферации дермальных фибробластов:

$$ПП = [1(ДД) + 2(ДС) + 3(ДП)] / 100\%,$$

где ПП — показатель пролиферации;
ДД — доля диффузных колоний, %;
ДС — доля смешанных колоний, %;
ДП — доля плотных колоний, %.

Следует отметить, что данное заключение также подтверждено авторами в процессе изучения типов колоний фибробластов и их корреляции с ферментом β-галактозидазой, ассоциированным с клеточным старением, SA-βgal [20–22] и маркером клеточной пролиферации Ki67 [23]. Исследования показали: в диффузных колониях по сравнению с плотными и смешанными самая большая доля SA-βgal-положительных клеток (**рис. 4**), при этом между долей диффузных колоний и долей фибробластов с фенотипом Ki67+ имеется выраженная обратная корреляция [24]. Полученные данные подтверждают, что диффузные колонии произошли от клеток-предшественников с наименьшей пролиферативной способностью, а доля диффузных колоний соответствует степени клеточного старения в популяции фибробластов кожи человека.

Каковы возможности косметологического ремоделирования дермы?

Современные косметологические методы, позволяющие ремоделировать микроструктуру дермы, можно разделить на 2 группы:

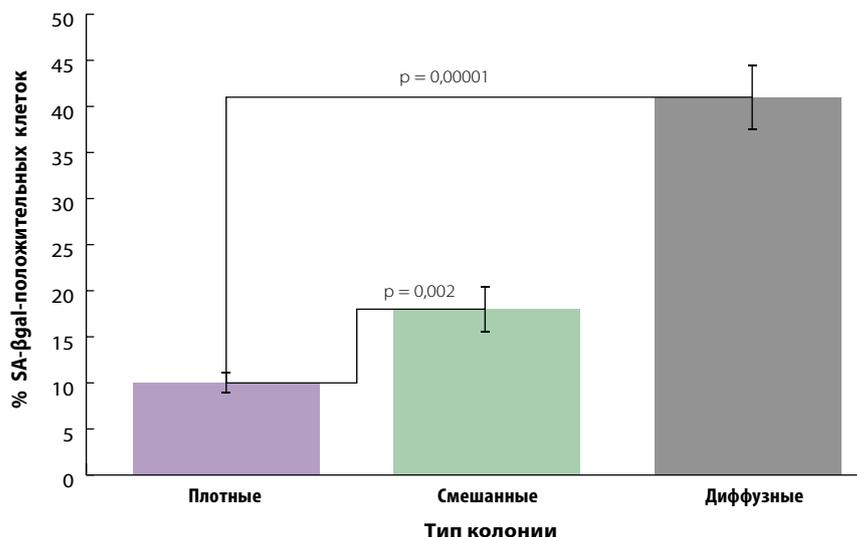


РИС. 4. Содержание SA-βgal-положительных клеток в колониях фибробластов различных типов, % [24]

- **к первой** относятся технологии, которые оказывают стимулирующее воздействие на резидентные (т.е. имеющиеся в дерме) фибробласты, например, лазерные технологии, PRP-терапия и пр.;
- **ко второй** — методы из области регенеративной медицины, основная цель которых — восполнение (замещение) уменьшающейся с возрастом клеточной популяции дермы за счет привнесения аутологичных функционально активных фибробластов (SPRS-терапия) [25].

Так, применение лазерных методов воздействия на кожу, в частности, фракционного фототермолиза (микроскопического термального фракционного повреждения дермы), предусматривает следующие процессы [3, 26–28].

Восстановление кожи после обработки лазером протекает по механизму заживления ран: с ремоделированием коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса дермы. Показано, что повреждение кожи лазером вызывает индукцию высокоорганизованного каскада молекулярных механизмов. После повреждения кожи в первой фазе (воспаление) наблюдается повышение уровня провоспалительных цитокинов, следовательно, и уровня разрушающих внеклеточный матрикс металлопротеиназ. Это, в свою

По количественному соотношению клеточных колоний разных типов в культуре составляют заключение о пролиферативном потенциале фибробластов кожи каждого пациента. При этом чем больше в культуре плотных колоний, тем выше у пациента пролиферативный потенциал дермальных фибробластов. И, соответственно, чем больше в культуре диффузных колоний, тем ниже пролиферативный потенциал фибробластов кожи пациента.

очередь, ведет к деградации коллагена. В следующей фазе, репаративной, происходит пролиферация фибробластов, продукция ими компонентов внеклеточного матрикса (включая коллаген) и, как следствие, восстановление микроструктуры дермы. Ремоделирование дермы и аккумуляция нового коллагена обеспечивают существенное улучшение состояния кожи.

При применении SPRS-терапии [8, 9, 25] – второго типа методов, основанного на восполнении уменьшившейся с возрастом численности фибробластов кожи, исходят из следующей концепции. Клетки-предшественники фибробластов кожи имеют достаточно высокий пролиферативный потенциал независимо от возраста человека (первичные культуры, полученные даже от очень пожилых людей, 95 лет, содержат до 14% МФ) [29]. С увеличением возраста отмечается снижение пролиферативного потенциала фибробластов кожи, находящихся под контролем генетических и эпигенетических факторов. Однако *in vitro* этот контроль нивелируется (или ослабевает) и наблюдается активация митотической активности клеток-предшественников.

Данному процессу в немалой степени способствуют и правильно подобранные условия культивирования клеток. При культивировании из небольшого биоптата кожи (диаметром 4 мм) можно получить необходимое для проведения эффективной клеточной терапии количество функционально активных фибробластов. Культивированные фибробласты кожи обладают способностью активно синтезировать компоненты внеклеточного матрикса, включая коллаген, эластин, гликозаминогликаны, факторы роста. После трансплантации в кожу биосинтетические потенциалы данных клеток сохраняются, и они активно в течение длительного времени (не менее года без какой-либо стимуляции) способны продуцировать компоненты внеклеточного матрикса дермы.

Клеточный материал вводится с помощью специальной техники – интрадермально линейно-ретроградным способом, с применением специальных

игл (30G, 13 мм), – которая позволяет равномерно, с адекватной плотностью по всей области кожи, требующей коррекции, пополнить пул резидентных фибробластов функционально активными клетками. При этом отмечается стимуляция активности и самих резидентных фибробластов. В результате наблюдается ремоделирование микроструктуры кожи: увеличиваются содержание коллагеновых и эластических волокон, гидратация и объем дермы, усиливаются эпидермальный морфогенез и гемомикроциркуляция [8, 9, 25]. Внешне это проявляется увеличением толщины, упругости и эластичности кожи, уменьшением количества и глубины морщин. Клинический эффект носит постепенно нарастающий (на протяжении 6–8 мес) и долговременный (от 2 лет и более) характер.

Таким образом, разнообразие современных методов эстетической коррекции ставит перед каждым врачом, практикующим в этой области медицины, ряд актуальных вопросов, связанных с проведением тех или иных процедур у конкретного пациента:

- какие процедуры показаны?
- как часто следует их проводить?
- каковы безопасные параметры их использования именно в этом случае (например, аппаратных процедур – лазерных или радиоволновых)?
- с какого возраста можно рекомендовать проведение вмешательств по эстетическим показаниям? и пр.

Сегодня, на наш взгляд, ответить на эти вопросы можно с большей точностью, если учитывать индивидуальные показатели регенераторного потенциала кожи, полученные при помощи описанной выше технологии под названием «Паспорт кожи®», основанной на методе индивидуального клонирования дермальных фибробластов [14]. К примеру, при низких показателях этих параметров проводить любые косметологические процедуры нужно с определенной осторожностью, чтобы не истощить и без того малый пул клеток-предшественников фибробластов.

Таким пациентам, прежде чем применять какие-либо методы воздействия на

кожу, необходимо провести курс SPRS-терапии, чтобы восполнить дефицит функционально активных клеток дермы. В то же время, если у пациента показатели регенераторного/пролиферативного потенциалов высокие или соответствуют норме, можно активно (согласно инструкции) использовать любые косметологические методы.

Заключение

Учет регенераторного потенциала кожи конкретного пациента не только позволит избежать многих осложнений, возможных при косметологических вмешательствах, но и может стать гарантом эффективности индивидуальной программы коррекции возрастных изменений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sorrell M., Caplan A.I. Fibroblasts – a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009; 276: 161–214.
2. Varani J., Dame M., Rittie L., et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin. Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *AJP* 2006; 168(6): 1861–1868.
3. Fisher G., Varani J., Voorhees J. Looking older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. *Arch Dermatol* 2008; 144(5): 666–672.
4. Fisher G., Kang S., Varani J., et al. Mechanism of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1462–1467.
5. Зорина А.И., Деев Р.Д., Зорин В.Л., Черкасов В.Р. Старение кожи, опосредованное фибробластами. Возможности терапевтической коррекции. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология* 2011; 5: 43–51.
6. Зорина А.И., Бозо И.Я., Зорин В.Л. и др. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности их клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2011; 6(2): 15–26.
7. Терехов С., Гацадзе А., Гринберг К. Клональная гетерогенность фибробластов разных тканей эмбриона человека *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1984; 5: 590–591.
8. Зорина А., Зорин В., Черкасов В. и др. Применение аутологических
9. дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи. Результаты постмаркетинговых исследований. *Эстетическая медицина* 2013; 12(1): 25–31.
10. Zorin V., Zorina A., Cherkasov V., et al. Clinical-instrumental and morphological evaluation of the effect of autologous dermal fibroblasts administration. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11: 778–786.
11. Чайлахян Р.К., Фриденштейн А.Я., Васильев А.В. Клонообразование в монослойных культурах костного мозга и селезенки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1970; 2: 94–98.
12. Лациник Н.В., Грошева А.Г., Наровлянский А.Н. и др. Клональная природа колоний фибробластов, образуемых стромальными костномозговыми клетками в культурах. *Бюлл эксп биол мед* 1987; 103(3): 356–358.
13. Friedenstain A., Deriglasova U., Kulagina N., et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83–92.
14. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 2006; 1: 2315–2319.
15. Зорин В.Л., Зорина А.И., Черкасов В.Р., Копнин П.Б. Способ диагностики состояния кожи пациента (варианты). Патент на изобретение RU 2466680, 2012.
16. Ryan J., Ostrow D., Breakfurd A., et al. A comparison of the proliferative and replicative life span kinetics of cell cultures derived from monozygotic twins. *In vitro* 1981; 17(1): 20–27.
17. Schneider E., Smith J. The relationship of *in vitro* studies to *in vitro* human aging. *International review of cytology* 1981; 69: 261–270.
18. Лебединская О.В., Горская Ю.Ф., Куралесова А.И. Морфологическая характеристика колоний стромальных клеток-предшественников в культурах гетеротопных трансплантатов костного мозга и селезенки мышей разного возраста. *Морфология: научно-теоретический медицинский журнал* 2004; 126(6): 46–49.
19. Владимирская Е.Б., Кошель И.В. Стромальные фибробласты нормального костного мозга у детей. *Гематология и трансфузиология* 1990; 1: 3–5.
20. Nolte S.V., Xu W., Rennekampff H.O., et al. Diversity of fibroblasts – a review on implications for skin tissue engineering cells tissues organs. *Cells Tissues Organs* 2008; 187: 165–176.
21. Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal betagalactosidase. *Aging Cell* 2006; 5: 187–195.
22. Itahana K., Campisi J., Dimri G.P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 2007; 371: 21–31.
23. Maier A.B., Westendorp R.G., VAN Heemst D. Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 323–332.
24. Juríková M., Danihel L., Polák Š., Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem* 2016; 118(5): 544–552.
25. Zorin V., Zorina A., Smetanina N., et al. Diffuse colonies of human skin fibroblasts in relation to cellular senescence and proliferation. *Aging* 2017; 9(5): 1403–1413.
26. Зорина А.И., Зорин В.Л., Черкасов В.Р., Исаев А.А. Метод коррекции возрастных изменений кожи с применением аутологических дермальных фибробластов. *Клиническая дерматология и венерология* 2013; 3: 30–37.
27. Orringer J., Rittie L., mHamilton T. Intraepidermal erbium: YAG laser resurfacing. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64(1): 119–128.
28. Orringer J., Kang S., Johoson T. Connective tissue remodeling induced by carbon dioxide laser resurfacing of photodamaged human skin. *Arch Dermatol* 2004; 140: 1326–1332.
29. Manstein D., Herron G., Sink R. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med* 2004; 34: 426–438.
30. Bayreuther K., Francz P.I., Rodemann H.P. Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Arch gerontol geriatr* 1992; 15 (Suppl 1): 47–74.